



51

**PCT**  
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>C07H 21/00, C12Q 1/68</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/34299</b> <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 15. Juni 2000 (15.06.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/09698 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 9. Dezember 1999 (09.12.99) <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 56 796.0      9. Dezember 1998 (09.12.98)      DE <b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> BIOCHIP TECHNOLOGIES GMBH [DE/DE]; Engesserstrasse 4b, D-79108 Freiburg i.Br. (DE). <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> KLAPPROTH, Holger [DE/DE]; Kehlerstrasse 12, D-79108 Freiburg (DE). BERNAUER, Hubert, S. [DE/DE]; Weberstrasse 38, D-79249 Merzhausen (DE). <b>(74) Anwalt:</b> VOSSIUS & PARTNER; Siebertstrasse 4, D-81675 München (DE).		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
<b>(54) Title:</b> CLEAVAGE OF CHEMICALLY SYNTHESIZED OLIGONUCLEOTIDES/POLYNUCLEOTIDES IN A DEFINED POSITION <b>(54) Bezeichnung:</b> SPALTUNG VON CHEMISCH SYNTHETISIERTEN OLIGO-/POLYNUCLEOTIDEN AN EINER VORBESTIMMTEN STELLE <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to an oligonucleotide/polynucleotide characterized by the general formula A[-X-B]<sub>n</sub>, where n is 1 or an integer multiple of 1 and A and B represent identical or different nucleic acid molecules. If n &gt; 1 B can represent identical or different nucleic acid molecules and X is a compound whose covalent bond(s) with A and B can be specifically cleaved by a chemical agent independently of the sequence. The invention also relates to a method for the chemical synthesis of an oligonucleotide/polynucleotide of the type described above. A different embodiment of the invention relates to a method for the chemical synthesis of a mixture of the at least two nucleic acid molecules A and B defined above.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Oligo-/Polynucleotid, das durch die allgemeine Formel A[-X-B]<sub>n</sub> gekennzeichnet ist, wobei n gleich 1 oder ein ganzzahliges Vielfaches von 1 ist, A und B gleiche oder verschiedene Nucleinsäuremoleküle darstellen, wobei im Falle von n &gt; 1 B gleiche oder verschiedene Nucleinsäuremoleküle darstellen kann, und X eine Verbindung ist, die und/oder deren kovalente Bindungen mit A und B durch ein Agens sequenzunabhängig und spezifisch gespalten werden kann/können. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur chemischen Synthese eines vorgenannten Oligo-/Polynucleotids. In einer anderen Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur chemischen Synthese eines Gemischs aus den mindestens zwei wie oben definierten Nucleinsäuremolekülen A und B.</p>		

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

### Spaltung von chemisch synthetisierten Oligo-/Polynucleotiden an einer vorbestimmten Stelle

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Oligo-/Polynucleotid, das durch die allgemeine Formel  $A[-X-B]_n$  gekennzeichnet ist, wobei  $n$  gleich 1 oder ein ganzzahliges Vielfaches von 1 ist, A und B gleiche oder verschiedene Nucleinsäuremoleküle darstellen, wobei im Falle von  $n > 1$  B gleiche oder verschiedene Nucleinsäuremoleküle darstellen kann, und X eine Verbindung ist, die und/oder deren kovalente Bindungen mit A und B durch ein Agens sequenzunabhängig und spezifisch gespalten werden kann/können. Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur chemischen Synthese eines vorgenannten Oligo-/Polynucleotids, das folgende Schritte umfaßt: (a) Synthese des Nucleinsäuremoleküls A, (b) kovalente Verknüpfung einer wie oben beschriebenen Verbindung X mit dem Nucleinsäuremolekül A, (c) Synthese des Nucleinsäuremoleküls B, wobei die Synthese des Nucleinsäuremoleküls B eine Elongation des im vorangehenden Schritt erzeugten Moleküls darstellt, und (d) gegebenenfalls ein- oder mehrmalige Wiederholung der Schritte (c) und (d). In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur chemischen Synthese eines Gemischs aus den mindestens zwei wie oben definierten Nucleinsäuremolekülen A und B, das folgende Schritte umfaßt: (a) Synthese des Nucleinsäuremoleküls A, (b) kovalente Verknüpfung einer wie oben definierten Verbindung X mit dem Nucleinsäuremolekül A, (c) Synthese des Nucleinsäuremoleküls B, wobei die Synthese des Nucleinsäuremoleküls B eine Elongation des im vorangehenden Schritt erzeugten Moleküls darstellt, (d) gegebenenfalls ein- oder mehrmalige Wiederholung der Schritte (c) und (d), und (e) Spaltung der Verbindung X und/oder deren kovalenter Bindungen mit den mindestens zwei Nucleinsäuremolekülen A und B.

Für die chemische DNA-Synthese wird heutzutage im wesentlichen die Amiditchemie angewendet (Köster und Heidmann, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 10 (1973), 859-860; Stengele und Pfeleiderer, Tetrahedron Letters 31 (1990), 2549-2552). Bei neueren Verfahren zur Synthese von DNA auf planaren Oberflächen, wie z.B. zur Herstellung

von sogenannten "Arrays", werden zunehmend auch photoreaktivierbare Gruppen verwendet (Ahmad Hasan, et al., Tetrahedron Letters 53 (1997), 4247-4264).

Für verschiedene Anwendungen werden Amidite von Nucleotidanaloga angeboten oder auch einfachere Verbindungen mit synthesesauglichen Amiditgruppen, welche dazu verwendet werden, Oligonucleotide mit kopplungsfähigen Gruppen, Haptenen oder beispielsweise mit Fluorochromen zu markieren.

Synthetische Oligonucleotide werden für eine Vielzahl von molekularbiologischen Verfahren verwendet, die zum größten Teil Varianten der Polymerasekettenreaktion (PCR-Technik) darstellen. Auch für die Hybridisierung auf soliden Oberflächen finden immobilisierte Oligonucleotide Verwendung. Beide Verfahren beruhen grundlegend auf der spezifischen Hybridisierung. Die PCR-Reaktion beruht auf der spezifischen Hybridisierung von mindestens zwei antipolar orientierten Primeroligonucleotiden an Matrizen-DNA in Lösung. Zur Anwendung der PCR-Reaktion wird mindestens ein Primerpaar benötigt. Andere Varianten der Methode, z.B. die "nested-primer"-PCR, oder die Multiplex-PCR benötigen drei oder mehr Primeroligonucleotide.

In der Regel werden Oligonucleotide an einer Festphase synthetisiert. Der meist verwendete Standard ist heutzutage CPG-Glas ("controlled pore size glass"), auf das über eine Succinsäureesterbindung jeweils eine der vier Basen als Start-Base angedockt ist. Neuerdings werden auch universelle Startermoleküle angeboten. Zu einer Oligonucleotidsynthese benötigt man in einer Syntheseinheit eine Säule mit CPG, die einen Platz in der Synthesemaschine belegt.

Wie vorstehend erwähnt, ist der Bedarf an chemisch hergestellten Nucleinsäuremolekülen bereits enorm groß, und ein Ende dieses weiter zunehmenden Bedarfs ist aufgrund der Entwicklung immer neuerer molekularbiologischer Verfahren, die auf der Verwendung von chemisch hergestellten Oligonucleotiden beruhen, nicht abzusehen. Aufgrund dieser großen Nachfrage besteht ein dringender Bedarf, sowohl die Kapazität der Synthesemaschinen als auch die Produktionskosten für Unternehmen, die solche Leistungen anbieten, zu senken. Neben der PCR-Technik existieren eine Reihe weiterer molekularbiologischer Techniken, die ebenfalls auf der Verwendung von zwei Oligonucleotiden beruhen, und, ähnlich wie im Fall der PCR-Technik, ist es auch bei diesen Verfahren von großer Wichtigkeit, daß die beiden Oligonucleotide in einem bestimmten molaren Verhältnis zueinander eingesetzt werden. Im Falle der PCR-Technik und in Fällen, in

denen z.B. doppelsträngige Oligonucleotide eingesetzt werden, ist das gewünschte molare Verhältnis in der Regel 1:1. Ist der Einsatz von zwei Oligonucleotiden erforderlich, wird herkömmlicherweise nach der Synthese der beiden Oligonucleotide, gegebenenfalls nach verschiedenen Behandlungsschritten, die Konzentration der Oligonucleotide bestimmt, um diese danach im Experiment in einem bestimmten molaren Verhältnis zueinander einzusetzen. Da der Einsatz von Oligonucleotiden in molaren Verhältnissen, die vom gewünschten Wert mehr oder weniger stark abweichen, zu unerwünschten Nebenreaktionen führen kann, die einen erheblichen negativen Einfluß auf die Quantität und Qualität eines Versuchsergebnisses haben können, ist der Fachmann in der Regel sehr bemüht, die Konzentrationen der Nucleinsäuren so exakt wie möglich zu bestimmen. Üblicherweise wird die Bestimmung der Konzentration einer Nucleinsäure photometrisch durchgeführt. Obwohl diese Methode prinzipiell Ergebnisse von ausreichender Genauigkeit liefern kann, existieren eine Reihe von Faktoren, die diese Genauigkeit beeinträchtigen können. So können z.B. Verunreinigungen in der nucleinsäurehaltigen Lösung, aber auch zu hohe Nucleinsäurekonzentrationen zu falschen Meßergebnissen führen, die wiederum zu falschen Konzentrationsberechnungen und schließlich zum Einsatz der Oligonucleotide in falschen molaren Verhältnissen führen. Somit besteht neben dem obengenannten Bedarf von wirtschaftlicher Seite ein weiterer Bedarf von wissenschaftlicher Seite, nämlich der Bedarf für eine Möglichkeit, Oligonucleotide in einem bestimmten molaren Verhältnis zueinander in einem Experiment einsetzen zu können, bei dem (ein) bestimmte(s) molares/molare Verhältnis(se) von zwei oder mehreren Nucleinsäuremolekülen wichtiger ist als die exakten absoluten Molaritäten.

Das dieser Erfindung zugrunde liegende technische Problem war dementsprechend, Möglichkeiten bereitzustellen, die die oben erwähnten Bedürfnisse befriedigen.

Dieses technische Problem wird durch die Bereitstellung der in den Ansprüchen charakterisierten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Oligo-/Polynucleotid, das durch die allgemeine Formel  $A[-X-B]_n$  gekennzeichnet ist, wobei  $n$  gleich 1 oder ein ganzzahliges Vielfaches von 1 ist, A und B gleiche oder verschiedene Nucleinsäuremoleküle darstellen, wobei im Falle von  $n > 1$  B gleiche oder verschiedene

Nucleinsäuremoleküle darstellen kann, und X eine Verbindung ist, die und/oder deren kovalente Bindungen mit A und B durch ein Agens sequenzunabhängig und spezifisch gespalten werden kann/können.

Der Begriff "Oligo-/Polynucleotid" umfaßt im Sinne der vorliegenden Erfindung sowohl Nucleinsäuremoleküle mit einer Länge von ungefähr 50 bis zu 100 oder mehr Nucleotiden als auch Oligonucleotide, die eine Länge zwischen 10 oder weniger Nucleotiden und ungefähr 50 Nucleotiden aufweisen. Des weiteren umfaßt der Begriff "Oligo-/Polynucleotid" insbesondere Ribo-, Desoxyribo- und Peptidnucleinsäuremoleküle, sowie Mischpolymere aus den vorgenannten Nucleinsäuremolekülen wie z.B. ein Oligo-/Polynucleotid, das aus einem Ribonucleinsäuremolekül A und einem Desoxyribonucleinsäuremolekül B besteht.

Der Begriff "Verbindung X" umfaßt im Sinne der vorliegenden Erfindung sowohl einzelne Atome als auch Moleküle und Makromoleküle, die aus mehreren, kovalent verknüpften Atomen bestehen.

Der Begriff "sequenzunabhängig" bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung, daß das Agens zur Spaltung der Verbindung X und/oder deren kovalenten Bindungen mit den Nucleinsäuremolekülen A und B nicht zuvor ein bestimmtes Sequenzmotiv, d.h. eine bestimmte Abfolge von Nucleotidbausteinen, erkennen muß, das sich innerhalb des Oligo-/Polynucleotids z.B. in unmittelbarem Anschluß vor und nach der Verbindung X oder auch in einem bestimmten Abstand von der Verbindung X entfernt befindet. Ist beispielsweise für die Spaltung die Erkennung ausschließlich der Verbindung X und/oder deren kovalenter Bindungen mit A und B notwendig, so ist diese Spaltung im Sinne der vorliegenden Erfindung sequenzunabhängig. Wäre jedoch die Verbindung X und/oder deren kovalente Bindungen mit A und B Teil eines Sequenzmotivs, das notwendigerweise zur Spaltung erkannt werden muß, so würde eine solche Spaltung im Sinne der vorliegenden Erfindung nicht als sequenzunabhängig gelten. Restriktionsendonucleasen sowohl des Typs II (Spaltung des Nucleinsäuremoleküls erfolgt innerhalb der Erkennungssequenz) als auch des Typs I oder III (Spaltung des Nucleinsäuremoleküls erfolgt außerhalb der Erkennungssequenz) erfüllen deshalb z.B. nicht die erfindungsgemäßen Kriterien der Sequenzunabhängigkeit.

Der Begriff "spezifisch" bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung, daß mittels des Agens nur die Verbindung X und/oder deren kovalente Bindungen mit den Nucleinsäuremolekülen A und B gespalten wird, ohne daß es zu einer Spaltung einer

oder mehrerer der Bindung(en) kommt, die die Nucleoside der Nucleinsäuremoleküle A und B verknüpft/verknüpfen und/oder Bestandteil der Nucleoside selbst ist/sind. Handelt es sich beispielsweise bei der Verbindung X und/oder deren kovalenten Bindungen mit A und B um die einzige(n) Phosphodiesterbindung(en), die durch eine Endonuclease gespalten wird/werden, so würde eine solche Spaltung im Sinne der vorliegenden Erfindung als spezifisch bezeichnet werden. Bindungen, die nicht durch Nucleasen gespalten werden können, sind z.B. Phosphorothioat-, Methylphosphonat- oder Peptidbindungen. Handelt es sich hingegen bei der Verbindung X und/oder deren kovalenten Bindungen mit A und B um eine oder mehrere Phosphodiesterbindungen, und wird das Oligo-/Polynucleotid mit einer unspezifisch spaltenden Endonuclease behandelt, so wird diese Behandlung im Sinne der vorliegenden Erfindung nicht als spezifische Spaltung betrachtet, sofern zwei oder mehrere der Nucleoside des Nucleinsäuremoleküls A und/oder B ebenfalls über (eine) Phosphodiesterbindung(en) miteinander verknüpft sind und diese auch durch die verwendete Endonuclease gespalten wird/werden. Eine chemische Modifikation des Oligo-/Polynucleotids und eine anschließende chemische Spaltung, wie sie z.B. bei der Sequenzierungsmethode nach Maxam & Gilbert eingesetzt wird, würde, um ein weiteres Beispiel zu geben, unter den Begriff "spezifische Spaltung" fallen, wenn durch eine solche Behandlung nur die Verbindung X und/oder deren kovalente Bindungen mit A und B gespalten werden würde. Würde eine solche Behandlung nicht nur zur Spaltung der Verbindung X und/oder deren kovalenten Bindungen mit A und B, sondern auch zur Spaltung von einer oder mehreren weiteren Bindungen in den Nucleinsäuremolekülen A und/oder B führen, so wäre dies keine spezifische Spaltung im Sinne der vorliegenden Erfindung.

Die Oligo-/Polynucleotide der vorliegenden Erfindung erlauben es vorteilhafterweise, Gemische herzustellen, die zwei oder mehrere Oligo- und/oder Polynucleotide in (einem) bestimmten Verhältnis(sen) enthalten. Enthält das erfindungsgemäße Polynucleotid beispielsweise 1 Nucleinsäuremolekül A und 1 Nucleinsäuremolekül B, so erhält man nach Spaltung der Verbindung X und/oder deren kovalenten Bindungen mit A und B ein Gemisch, das das Nucleinsäuremolekül A und B exakt oder im wesentlichen im Verhältnis 1:1 enthält. Enthält das erfindungsgemäße Polynucleotid z.B. 2, 3 oder 4 Kopien des Nucleinsäuremoleküls B, so lassen sich Gemische herstellen, die die Nucleinsäuremoleküle A und B exakt oder im wesentlichen im Verhältnis 1:2, 1:3 oder 1:4 enthalten. Es ist zu erwarten, daß je nach Wahl der Oligo-

/Polynucleotidsequenz und/oder der Verbindung X und/oder deren kovalenter Bindungen mit A und B und des entsprechenden Agens, möglicherweise nicht jedes Oligo-/Polynucleotid oder gegebenenfalls nicht jede Verbindung X und/oder deren kovalente Bindungen innerhalb eines Oligo-/Polynucleotids mittels des Agens gespalten wird, so daß das erzielte Verhältnis vom theoretisch erwarteten Wert geringfügig abweichen kann. Solche möglicherweise auftretenden geringfügigen Abweichungen von dem theoretisch erwarteten Verhältnis verleihen den entsprechenden Nucleinsäuregemischen nichtsdestotrotz die erfindungsgemäßen vorteilhaften Eigenschaften, wodurch solche Gemische ebenfalls von der vorliegenden Erfindung umfaßt sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Oligo-/Polynucleotid durch die allgemeine Formel  $3'-A[-X-B]_n-5'$  oder  $5'-A[-X-B]_n-3'$  gekennzeichnet.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Oligo-/Polynucleotid ist  $1 \leq n < 100$ . In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist  $1 \leq n < 50$ , und am meisten bevorzugt ist  $1 \leq n < 10$ .

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur chemischen Synthese eines Oligo-/Polynucleotids wie oben beschrieben, das folgende Schritte umfaßt: (a) Synthese des Nucleinsäuremoleküls A, (b) kovalente Verknüpfung einer wie oben definierten Verbindung X mit dem Nucleinsäuremolekül A, (c) Synthese des Nucleinsäuremoleküls B, wobei die Synthese des Nucleinsäuremoleküls B eine Elongation des im vorangegangenen Schritt erzeugten Moleküls darstellt, und (d) gegebenenfalls ein- oder mehrmalige Wiederholung der Schritte (b) und (c), wobei die Nucleinsäuresynthese nach üblichen, dem Fachmann bekannten Verfahren durchgeführt wird (Köster und Heidmann, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 10 (1973), 859-860; Stengele und Pfeleiderer, Tetrahedron Letters 31 (1990), 2549-2552).

Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur chemischen Synthese eines Gemischs aus den mindestens zwei wie oben definierten Nucleinsäuremolekülen A und B, das folgende Schritte umfaßt: (a) Synthese des



Nucleinsäuremoleküls A, (b) kovalente Verknüpfung einer wie oben definierten Verbindung X mit dem Nucleinsäuremolekül A, (c) Synthese des Nucleinsäuremoleküls B, wobei die Synthese des Nucleinsäuremoleküls B eine Elongation des im vorangegangenen Schritt erzeugten Moleküls darstellt, (d) gegebenenfalls ein- oder mehrmalige Wiederholung der Schritte (b) und (c), und (e) Spaltung der Verbindung X und/oder deren kovalenten Bindungen mit den mindestens zwei Nucleinsäuremolekülen A und B, wobei darunter selbstverständlich auch Ausführungsformen fallen, in denen nach Wiederholung der Schritte (b) und (c) die Bindung(en) in B-X-B gespalten werden können, und wobei die Nucleinsäuresynthese nach üblichen, dem Fachmann bekannten Verfahren durchgeführt wird (Köster und Heidmann, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 10 (1973), 859-860; Stengele und Pfeleiderer, Tetrahedron Letters 31 (1990), 2549-2552).

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das Oligo-/Polynucleotid oder die mindestens zwei Nucleinsäuremoleküle A und B gekoppelt an einer Festphase synthetisiert.

Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt es vorteilhafterweise, die Synthesekosten dadurch zu reduzieren, daß die Kosten für das Festphasenmaterial halbiert bzw. noch weiter reduziert werden, da zwei oder mehr Oligo- und/oder Polynucleotide gekoppelt an einer Festphase synthetisiert werden, und nicht für jedes Oligo- und/oder Polynucleotid separat Festphasenmaterial bereitgestellt werden muß. Die Kopplung an die Festphase erfolgt vorteilhafterweise nach konventionellen Verfahren.

Weiterhin eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren auch dazu, Zusammensetzungen herzustellen, die nur Nucleinsäuremoleküle enthalten, die aus der vollständigen gewünschten Sequenz bestehen und nicht mit Molekülen verunreinigt sind, die aufgrund eines frühzeitigen Abbruchs der Synthese nicht die vollständige gewünschte Sequenz aufweisen. Wird beispielsweise für ein Nucleinsäuremolekül A eine Sequenz gewählt, die komplementär zu der Sequenz eines Nucleinsäuremoleküls B ist, und ist das zu synthetisierende Oligo-/Polynucleotid so an die Synthesematrix gekoppelt, daß es bei Spaltung der Verbindung X und/oder deren kovalenten Bindungen mit A und B nicht von der Synthesematrix abgespalten wird, so erhält man nach der Synthese des Oligo-/Polynucleotids und Spaltung der Verbindung X und/oder deren kovalenten Bindungen mit A und B ein an die Synthesematrix gekoppeltes Nucleinsäuremolekül

A und ein in Lösung vorhandenes Nucleinsäuremolekül B, das aufgrund der Komplementarität der Sequenzen an das Nucleinsäuremolekül A hybridisieren kann. Über einen Temperaturgradient lassen sich nun "affinitätschromatographisch" alle Nucleinsäuremoleküle B abtrennen, die nicht die vollständige gewünschte Sequenz aufweisen, da diese abhängig von der Anzahl der hybridisierenden Nucleotide, die im Vergleich zu der vollständigen Sequenz fehlen, ab einer entsprechend hohen Temperatur nicht mehr in der Lage sind, mit dem Nucleinsäuremolekül A zu hybridisieren, und bei entsprechend hoher Temperatur nur noch in ihrer Sequenz vollständige Nucleinsäuremoleküle B hybridisieren. Auf diese Weise aufgereinigte in ihrer Sequenz vollständige Nucleinsäuremoleküle B lassen sich schließlich z.B. durch kurzes Erhitzen auf 100°C isolieren.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren nach dem letzten Schritt eine Abspaltung des Oligo-/Polynucleotids oder des Nucleinsäuremoleküls A von der Festphase (Synthesematrix).

Die erfindungsgemäßen Verfahren erlauben es dem Fachmann also vorteilhafterweise, mittels einer Synthese zwei oder mehrere Oligo- und/oder Polynucleotide herzustellen. Neben den oben diskutierten Vorteilen, weisen die erfindungsgemäßen Verfahren eine Reihe weiterer vorteilhafter Eigenschaften auf. Zu diesen Eigenschaften zählt u.a., daß die Synthesekapazität von Nucleinsäure-Synthesemaschinen deutlich erhöht werden kann. Ist das Ziel der Synthese beispielsweise ein Gemisch von zwei Oligonucleotiden, so können bei Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens die zwei Oligonucleotide wie im Falle der Synthese eines einzelnen Oligonucleotids auf einer Synthesematrix synthetisiert werden. Außerdem findet nur eine Programmierung des Geräts statt. Wird eine Nucleinsäure-Synthesemaschine nun mit einer maximal möglichen Anzahl von Syntheseeinheiten bestückt, so wird durch das erfindungsgemäße Verfahren aufgrund der Reduktion der notwendigen Arbeitsschritte die Synthesekapazität der Synthesemaschine deutlich erhöht.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Festphase eine planare Oberfläche oder "controlled pore size glass" (CPG).

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Oligo-/Polynucleotid bzw. ein oder mehrere der mindestens zwei Nucleinsäuremoleküle A und B mit einer kopplungsfähigen Gruppe, einem Hapten, einem Chromophor, einem oder mehreren Fluorophoren, einem oder mehreren Chelatoren, einer enzymatisch modifizierbaren Gruppe oder einem Paar von modifizierenden Gruppen markiert.

Ein Paar von modifizierenden Gruppen kann z.B. ein Fluorophor und ein Quencher-Molekül umfassen, oder ein Paar von Fluorophoren, die in der Lage sind, Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) durchzuführen. Chelatoren können verwendet werden, um verschiedene Metalle und Übergangsmetalle wie z.B. fluoreszierendes Europium oder Ruthenium zu binden und damit das Emissionsspektrum einer Fluoreszenzanregung zugunsten einer vorteilhafteren Filterkombination zu verschieben.

In einer zusätzlichen bevorzugten Ausführungsform des Oligo-/Polynucleotids oder des Verfahrens der vorliegenden Erfindung weisen die mindestens zwei Nucleinsäuremoleküle A und B eine Länge zwischen 2 und 40 Nucleotiden auf.

Stellt es sich heraus, daß z.B. bestimmte Di-, Tri- oder Tetramere eine besondere z.B. therapeutische oder prophylaktische Wirkung besitzen, so lassen sich mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens solche Nucleinsäuremoleküle enthaltende Lösungen einfach und kostengünstig herstellen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die mindestens zwei Nucleinsäuremoleküle A und B eine Länge zwischen 10 und 30 Nucleotiden auf.

In einer anderen besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die mindestens zwei Nucleinsäuremoleküle A und B eine Länge zwischen 13 und 25 Nucleotiden auf.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind das Oligo-/Polynucleotid oder die mindestens zwei Nucleinsäuremoleküle A und B einzelsträngig.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind die mindestens zwei Nucleinsäuremoleküle A und B Primer für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

Die vorliegende Erfindung erlaubt es natürlich auch, Oligonucleotide für Techniken herzustellen, die Varianten der PCR darstellen. Solche Techniken wie beispielsweise die sogenannte "Ligase Chain Reaction" (LCR) sind dem Fachmann bekannt (Lee, *Biologicals* 3 (1996), 197-199; Barany, *PCR Methods Appl.* 1 (1991), 5-16).

Die mindestens zwei Nucleinsäuremoleküle A und B können im Sinne der vorliegenden Erfindung jedoch auch zwei in ihrer Sequenz komplementäre Nucleinsäuremoleküle sein. Nach Spaltung der Verbindung X und/oder deren kovalenten Bindungen mit A und B kann eine Hybridisierung der komplementären Nucleinsäuremoleküle z.B. durch kurzes Erhitzen und langsames Abkühlen der die Nucleinsäuremoleküle enthaltenden Lösung erzielt werden. Da die Nucleinsäuremoleküle z.B. im Verhältnis 1:1 vorliegen, erlaubt es die vorliegende Erfindung, doppelsträngige Nucleinsäuremoleküle herzustellen, die im wesentlichen nicht durch einzelsträngige Nucleinsäuremoleküle verunreinigt sind. Auf diese Weise hergestellte doppelsträngige Nucleinsäuremoleküle können vorteilhafterweise z.B. als Linker eingesetzt werden, die an die Enden von DNA- oder RNA-Fragmenten ligiert werden können und somit diese Fragmente mit Restriktionsendonuclease-Schnittstellen z.B. zu Clonierungszwecken versehen. Die erfindungsgemäß hergestellten doppelsträngigen Nucleinsäuremoleküle können auch in sogenannten "Electrophoretic Mobility Shift Assays" (EMSAs) eingesetzt werden. Durch entsprechende Wahl der Sequenzen und entsprechender Anzahl von Nucleinsäuremolekülen B ist es mittels der erfindungsgemäßen Verfahren natürlich auch möglich, Gemische von verschiedenen doppelsträngigen Nucleinsäuremolekülen herzustellen. Die erfindungsgemäß hergestellten doppelsträngigen Nucleinsäuremoleküle bzw. die Gemische von verschiedenen doppelsträngigen Nucleinsäuremolekülen eignen sich auch für die einfache und kostengünstige Herstellung von Arrays von beispielsweise dsDNA zur Analyse von proteinbindenden Sequenzen, wie beispielsweise Transkriptionsfaktoren und deren Komplexe. Wie in Martha L. Bulyk, et al., *Nature Biotechnology* 17 (1999), 573-577, Robert Carlson & Roger Brent, *Nature Biotechnology* 17 (1999), 536-537, sowie Eckhard Nordhoff, et al., *Nature Biotechnology* 17 (1999), 884-888, beschrieben, ist es möglich, dsDNA-Moleküle mit spezifischen Sequenzen an geeignete Oberflächen zu binden und so die

Bindungseigenschaften von DNA-bindenden Proteinen und deren Komplexe zu analysieren. Analog dazu können erfindungsgemäß hergestellte dsRNA-Moleküle oder Mischpolymere aus DNA und RNA sowie einzelsträngige Nucleinsäuremoleküle zur Herstellung von Nucleinsäure-Arrays verwendet werden.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung außerdem ein Verfahren zur Herstellung eines Arrays von Nucleinsäuremolekülen, umfassend die Schritte des erfindungsgemäßen Verfahrens und weiterhin den Schritt: (f) Immobilisierung der Nucleinsäuremoleküle an definierten Positionen auf einem Träger.

Verfahren zur Immobilisierung von Nucleinsäuremolekülen auf Trägermaterialien sowie geeignete Matrizen sind dem Fachmann bekannt (z.B. R. Schwerdtle et al., Labchips und Microarrays für biotechnologische Anwendungen, medizinische Genetik Nr. 1, 11. Jahrgang (1999)). Unabhängig davon, ob die Nucleinsäure-Trägermoleküle als funktionelle Rezeptoren für die in einem Analytengemisch nachzuweisenden bzw. zu quantifizierenden spezifischen Liganden auf der Trägermatrix des Chips oder Kügelchens *in situ* z.B. mittels photolithographischer Techniken unter Verwendung von physikalischen Masken synthetisiert oder mittels verschiedener Kontakt- oder Nichtkontaktverfahren aufgedruckt (gespottet) werden, erfolgt die Chipherstellung stets auf Basis einer festen Matrix, zu deren Herstellung beispielsweise Silikone, Quarz und Glas sowie zunehmend Polymermaterialien eingesetzt werden. Diese feste Trägermatrix wird üblicherweise anschließend aktiviert und/oder mit einer als Kopplungsmatrix bezeichneten Schicht beaufschlagt, um die gewünschten Nucleinsäure-Rezeptoren synthetisieren oder aufdrucken zu können.

Grundsätzlich erfolgt die Aktivierung zur Bereitstellung kopplungsfähiger reaktiver Gruppen auf der Oberfläche der Trägermatrix. Gewöhnlich werden für diesen Zweck Säuren eingesetzt wie z.B. Caro'sche Säure (20%  $\text{H}_2\text{O}_2$ /80%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) und HCl. Weitere Aktivierungsmittel sind dem Fachmann bekannt.

Wird als Trägermatrix Glas eingesetzt, muß die Glasoberfläche vor der Synthese bzw. vor dem Aufdrucken der Rezeptoren in geeigneter Weise beschichtet werden, um die Hydrophobizität der Oberfläche zu erhöhen. Im Gegensatz dazu werden beim Aufdrucken vorgefertigte Nucleinsäure-Moleküle kovalent oder nicht-kovalent auf der festen Trägermatrix immobilisiert. Die nicht-kovalente Immobilisierung kann z.B. über Biotin-Streptavidin-vermittelte Sondenkopplung oder über das Bedrucken von mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasoberflächen erfolgen.

Bei der *in situ*-Synthese wird die Oberfläche üblicherweise mit einem Silan beschichtet, an das ein eine Hydroxylgruppe tragendes Verbindungsmolekül gekoppelt wird, von dem ausgehend die Oligonukleotidsynthese nach dem etablierten CPG-Phosphoramidit-Verfahren erfolgt. Bei modifizierten Verfahren wird die Hydroxylgruppe des Verbindungsmoleküls mit einer photolabilen Schutzgruppe versehen, welche nach UV-Bestrahlung wieder entfernt werden kann und dadurch die Ankopplung eines gewünschten Phosphoramiditmonomers ermöglicht.

Eine Möglichkeit liegt in der Anwendung standardisierter photolithografischer Verfahren, die entweder nach erfolgter Polymerisierung (Photoablation der Polymere mittels (virtueller) Masken), vor der Polymerisierung (Photoabbau oder Photoablation der monomolekularen Initiatorschicht mittels (virtueller) Masken), oder während der Reaktion durch Masken-vermittelte Photopolymerisation angewendet werden können. Andere mögliche Techniken zur Schaffung einer rasterartig angelegten monomolekularen Initiator- bzw. Polymerschicht umfassen verschiedene Druckverfahren wie z.B. Kontaktverfahren mit Hilfe von Kapillarnadeln („Pin-Technik“) oder Nichtkontaktverfahren auf Basis von piezoelektronischen Tintenstrahldüsen und dergleichen, welche während der Bildung der Initiatorschicht oder während der Polymerisation angewendet werden können. Unter Anwendung einer oder mehrerer dieser Techniken können Oberflächenstrukturen mit Abmessungen im Mikrometerbereich geschaffen werden.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Verbindung X ein 5'-O-(o-Nitrophenyl)alk-oxycarbonylnucleosid, ein Dicarbonsäure-di-cis-diolester oder eine thermisch spaltbare Verbindung.

Thermisch spaltbare Verbindungen, die vorteilhafterweise im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden können, sind beispielsweise solche, die durch eine thermisch induzierte Cycloreversion des Typs (4+2) nach Diels-Alder gespalten werden können.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Oligo-/Polynucleotids oder des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Verbindung X 5'-oder 3'-O-[2,2'-Di-(2-Nitrophenyl)ethoxycarbonyl]-thymidin, Succinyl-2,3-dihydroxytetrafuran oder Di-1,2-Hydroxycyclopentansuccinsäurediester.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das Agens ein chemisches und/oder physikalisches Agens.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das chemische Agens eine Säure oder Base.

Idealerweise wird/werden für die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens die Verbindung(en) X und/oder deren kovalente Bindungen mit A und B so gewählt, daß die Behandlung des Polynucleotids zur Abtrennung von der Festphase nach der Synthese oder zur Abspaltung der zum Schutz der Basen vorhandenen chemischen Gruppen auch zu einer Spaltung der Verbindung X und/oder deren kovalenten Bindungen mit A und B führt. Somit kann A auch über X an die Matrix gebunden sein. Eine übliche Behandlung zur Abspaltung der Schutzgruppen von chemisch synthetisierten Nucleinsäuremolekülen ist die mehrstündige Inkubation bei ca. 55°C in einer konzentrierten Ammoniaklösung. Wird/werden nun während der Synthese des Polynucleotids eine oder mehrere Verbindung(en) X inkorporiert, die und/oder deren kovalente Bindungen mit A und B durch Alkalibehandlung gespalten wird/werden, so erhält man in einem Arbeitsschritt ein Gemisch von einsatzbereiten Nucleinsäuremolekülen.

In einer zusätzlichen besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Spaltung der Verbindung X und/oder deren kovalenter Bindungen mit den mindestens zwei Nucleinsäuremolekülen A und B thermisch und/oder photoinduziert.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Spaltung der Verbindung X und/oder deren kovalenter Bindungen mit den mindestens zwei Nucleinsäuremolekülen A und B eine Eliminierungsreaktion, eine intramolekulare Umlagerungsreaktion, eine hydrolytische Reaktion, die Umkehrung einer Additionsreaktion oder eine Cycloreversion.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die Spaltung der Verbindung X und/oder deren kovalenter Bindungen mit A und B eine  $\beta$ -Eliminierungsreaktion, eine Umkehrung einer Michaelis-Addition, eine Woodward-Hoffmann-Reaktion oder eine Diels-Alder-Reaktion.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Oligo-/Polynucleotids oder Verfahrens erzeugt die Spaltung der Verbindung X und/oder deren kovalenter Bindungen mit den mindestens zwei Nucleinsäuremolekülen A und B eine 5'- und 3'-OH-Gruppe oder eine 5'-Phosphatgruppe und eine 3'-OH-Gruppe in den mindestens zwei Nucleinsäuremolekülen A und B.

Die in dieser Anmeldung zitierten Publikationen sind hiermit per Referenz in die Anmeldung inkorporiert.

Die Figuren zeigen:

Figur 1: Schematische Darstellung der internen Spaltungsreaktion in einem Oligonucleotid an einer vorbestimmten Stelle durch Einbau einer labilen Amiditverbindung während der Synthese, und nachfolgende Spaltungsreaktion:

M = Synthesematrix, O = labile Gruppe, - = Sequenz.

Figur 2: Plasmidclonierung und Linkeradaptor.

A: Plasmidende links (HindIII, schwarzer Balken),

B: Adaptor (HindIII, hellgrauer Balken, EcoRI),

C: zu ligierendes Fragment (EcoRI, dunkelgrauer Balken, AatII),

D: Plasmidende rechts (AatII, schwarzer Balken).

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

### Beispiel 1

Für eine Clonierungsreaktion wird ein doppelsträngiges Adaptormolekül benötigt, das in einer eigentlich inkompatiblen Ligationsreaktion eine geeignete Verbindung schafft zwischen einem Plasmid und einem zu ligierenden Fragment. Dies wird durch Inkorporation einer neuen Restriktionsschnittstelle mit geeignetem Überhang bewerkstelligt.



Üblicherweise würden nun zwei Oligonucleotide bei dem Synthesedienstleister bestellt, die

1. teilweise komplementär zueinander sind, des weiteren
2. teilweise komplementär sind mit passenden einzel-strängigen Überhängen, zum einen an dem einen Plasmidende (A:B),
3. zum anderen am linken Ende des zu ligierenden Fragmentes (B:C)

Das Syntheselabor würde für je einen Strang der Einzelstrang-DNA zwei Synthesen durchführen, und der Forscher müßte dann zur Herstellung des Adaptors die beiden einzelsträngigen DNAs in exakt dem gleichen Verhältnis mischen und diese dann für die Clonierung vorbereiten.

Im vorliegenden Falle wurden die beiden einzelsträngigen DNAs jedoch in einer Synthese hintereinandergeschaltet und zeitgleich in der gleichen Synthesesäule synthetisiert, indem die beiden Sequenzen bei der Synthese durch den Einbau eines Di-Diol-Succinsäureesteramidits miteinander verbunden wurden.

Bei der Ammoniumabspaltung der Schutzgruppen nach der Synthese spalten sich die beiden einzelsträngigen Oligos voneinander ab und können sich dann aneinanderlagern. Das richtige stöchiometrische Verhältnis (1:1) wurde durch das Syntheseverfahren bereits eingestellt. Das Adaptormolekül konnte so fertig zur Ligation direkt ausgeliefert werden.

Ligationspuffer:

1  $\mu$ l Ligationspuffer (T4-DNA-Ligase, BioLabs)

1  $\mu$ l Ligase (1 U)

1  $\mu$ l Plasmid pNEB193 (50 ng)

1  $\mu$ l Fragment pAO1-15 (150 ng)

1  $\mu$ l Adaptoroligonucleotid (10 ng)

5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O

10  $\mu$ l Gesamtansatz

Die Ligrationsreaktion erfolgte 5 h bei 16°C. Der Ligrationsansatz wurde mit Ethanol gefällt und mit 70% Ethanol anschließend gewaschen, getrocknet und nach

Standardprotokoll in kompetente DH10 $\alpha$ -E. coli Zellen transformiert und auf Ampicillinplatten (50  $\mu$ g/ml, Amp) plattiert. Zwanzig Transformanten wurden ausgewählt und in LB-Medium (50  $\mu$ g/ml Ampicillin) angezogen.

Die Analyse der Transformanten erfolgte nach der Plasmidpräparation-Alkali-Methode: A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA, Birnboim, HC., Methods Enzymol. 1983; 100: 243-55 mittels Restriktionsanalyse (EcoRI-AatII).

### Beispiel 2

Für eine generelle PCR-Strategie zum Nachweis und zur Differenzierung verschiedener Lactobacillenspezies wie z.B. Lactobacillus fermentum, L. fructivorans, L. brevis und/oder L. cremoris in Sauerteig wurden im stöchiometrischen Verhältnis (1:1) ein Primer-Paar zum Nachweis der 16S RNA auf einem DNA-Array eingesetzt.

41f-Primer: GCTCAGATTGAACGCTGGCG

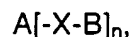
1066R-Primer: ACATTTCACAACACGAGCTG

Mit diesem Primerpaar aus hochkonservierten Sequenzen ist es möglich, die divergierenden Sequenzen aus vielen verschiedenen Bakterienspezies, die zwischen den Primersequenzen liegen, zu amplifizieren und in einem Hybridisierungsexperiment voneinander zu trennen, wobei die entstehenden Signale einer bestimmten Bakterienspezies zugeordnet werden können.

Die entsprechenden Primersequenzen wurden in einer Oligonucleotid-Synthese in einer Sequenzfolge am Stück synthetisiert. Die einzelnen Sequenzabschnitte wurden durch den Einbau von Trityl-di-cis-diol-dicarbonsäureamidite miteinander verbunden. Bei der Ammoniumabspaltung der Schutzgruppen nach der Synthese spalteten sich die zwei verschiedenen einzelsträngigen Oligos voneinander ab und können direkt in der PCR-Reaktion Verwendung finden. Das Primerpaar konnte in einer Synthese hergestellt und direkt im PCR-Experiment eingesetzt werden. Die entstehenden Fragmente wurden zum Hybridisierungsexperiment mit FITC-dUTP intern markiert.

Patentansprüche

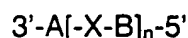
1. Oligo/Polynucleotid, gekennzeichnet durch die allgemeine Formel:



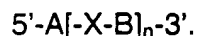
wobei:

- (i) n gleich 1, oder ein ganzzahliges Vielfaches von 1 ist;
- (ii) A und B gleiche oder verschiedene Nucleinsäuremoleküle darstellen, wobei im Falle von  $n > 1$  B gleiche oder verschiedene Nucleinsäuremoleküle darstellen kann; und
- (iii) X eine Verbindung ist, die und/oder deren kovalente Bindungen mit A und B durch ein Agens sequenzunabhängig und spezifisch gespalten werden kann/können.

2. Oligo-/Polynucleotid nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch die allgemeine Formel



oder



3. Verfahren zur chemischen Synthese eines Oligo-/Polynucleotids nach Anspruch 1 oder 2, umfassend die Schritte:

- (a) Synthese des Nucleinsäuremoleküls A;
- (b) kovalente Verknüpfung einer Verbindung X, wie in Anspruch 1 definiert, mit dem Nucleinsäuremolekül A;
- (c) Synthese des Nucleinsäuremoleküls B, wobei die Synthese des Nucleinsäuremoleküls B eine Elongation des in Schritt (b) erzeugten Moleküls darstellt; und
- (d) gegebenenfalls ein- oder mehrmalige Wiederholung der Schritte (b) und (c).

4. Verfahren zur chemischen Synthese eines Gemischs aus den mindestens zwei Nucleinsäuremolekülen A und B wie in Anspruch 1 oder 2 definiert, umfassend die Schritte:
  - (a) Synthese des Nucleinsäuremoleküls A;
  - (b) kovalente Verknüpfung einer Verbindung X wie in Anspruch 1 definiert mit dem Nucleinsäuremolekül A;
  - (c) Synthese des Nucleinsäuremoleküls B, wobei die Synthese des Nucleinsäuremoleküls B eine Elongation des im Schritt (b) erzeugten Moleküls darstellt;
  - (d) gegebenenfalls ein- oder mehrmalige Wiederholung der Schritte (b) und (c); und
  - (e) Spaltung der Verbindung X und/oder deren kovalenter Bindungen mit den mindestens zwei Nucleinsäuremolekülen A und B.
5. Verfahren nach Anspruch 3 oder 4, wobei das Oligo-/Poly-nucleotid oder die mindestens zwei Nucleinsäuremoleküle A und B gekoppelt an eine Festphase synthetisiert werden.
6. Verfahren nach Anspruch 5, das nach Schritt (d) oder (e) eine Abspaltung des Oligo-/Polynucleotids oder des Nucleinsäuremoleküls A von der Festphase umfaßt.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, wobei die Festphase eine planare Oberfläche oder "controlled pore size glass" (CPG) ist.
8. Oligo-/Polynucleotid nach Anspruch 1 oder 2, oder Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 7, wobei das Oligo-/Polynucleotid oder ein oder mehrere der mindestens zwei Nucleinsäuremoleküle A und B mit einer kopplungsfähigen Gruppe, einem Hapten, einem Chromophor, einem oder mehreren Fluorophor(en), einem oder mehreren Chelator(en), einer enzymatisch modifizierbaren Gruppe oder einem Paar von modifizierenden Gruppen markiert ist.

9. Oligo-/Polynucleotid nach Anspruch 1, 2 oder 8, oder Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 8, wobei die mindestens zwei Nucleinsäuremoleküle A und B eine Länge zwischen 2 und 40 Nucleotiden aufweisen.
10. Oligo-/Polynucleotid oder Verfahren nach Anspruch 9, wobei die mindestens zwei Nucleinsäuremoleküle A und B eine Länge zwischen 10 und 30 Nucleotiden aufweisen.
11. Oligo-/Polynucleotid oder Verfahren nach Anspruch 10, wobei die mindestens zwei Nucleinsäuremoleküle A und B eine Länge zwischen 13 und 25 Nucleotiden aufweisen.
12. Oligo-/Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 8 bis 11, oder Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 11, wobei das Oligo-/Polynucleotid oder die mindestens zwei Nucleinsäuremoleküle A und B einzelsträngig sind.
13. Oligo-/Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 8 bis 12, oder Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 12, wobei die mindestens zwei Nucleinsäuremoleküle A und B Primer für eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sind.
14. Oligo-/Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 8 bis 13, oder Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 13, wobei die Verbindung X ein 5'-O-(o-Nitrophenyl)alkoxy-carbonylnucleosid, ein Dicarbonsäure-di-cis-diolester oder eine thermisch spaltbare Verbindung ist.
15. Oligo-/Polynucleotid oder Verfahren nach Anspruch 14, wobei die Verbindung X 5'- oder 3'-O-[2,2'-Di-(2-Nitrophenyl)ethoxycarbonyl]-thymidin, Succinyl-2,3-dihydroxytetra-furan oder Di-1,2-Hydroxycyclopentansuccinsäurediester ist.
16. Oligo-/Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 8 bis 15, oder Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 15, wobei das Agens ein chemisches und/oder physikalisches Agens ist.

17. Oligo-/Polynucleotid oder Verfahren nach Anspruch 16, wobei das chemische Agens eine Säure oder Base ist.
18. Oligo-/Polynucleotid oder Verfahren nach Anspruch 16 oder 17, wobei die Spaltung der Verbindung X und/oder deren kovalenter Bindungen mit den mindestens zwei Nucleinsäuremolekülen A und B thermisch und/oder photoinduziert ist.
19. Oligo-/Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 8 bis 18, oder Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 18, wobei die Spaltung der Verbindung X und/oder deren kovalenter Bindungen mit den mindestens zwei Nucleinsäuremolekülen A und B eine Eliminierungsreaktion, eine intramolekulare Umlagerungsreaktion, eine hydrolytische Reaktion, die Umkehrung einer Additionsreaktion oder eine Cycloreversion ist.
20. Oligo-/Polynucleotid nach einem der Ansprüche 1, 2 oder 8 bis 19, oder Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 19, wobei die Spaltung der Verbindung X und/oder deren kovalenter Bindungen mit den mindestens zwei Nucleinsäuremolekülen A und B eine 5'- und 3'-OH-Gruppe oder eine 5'-Phosphatgruppe und eine 3'-OH-Gruppe in den mindestens zwei Nucleinsäuremolekülen A und B erzeugt.

1/2

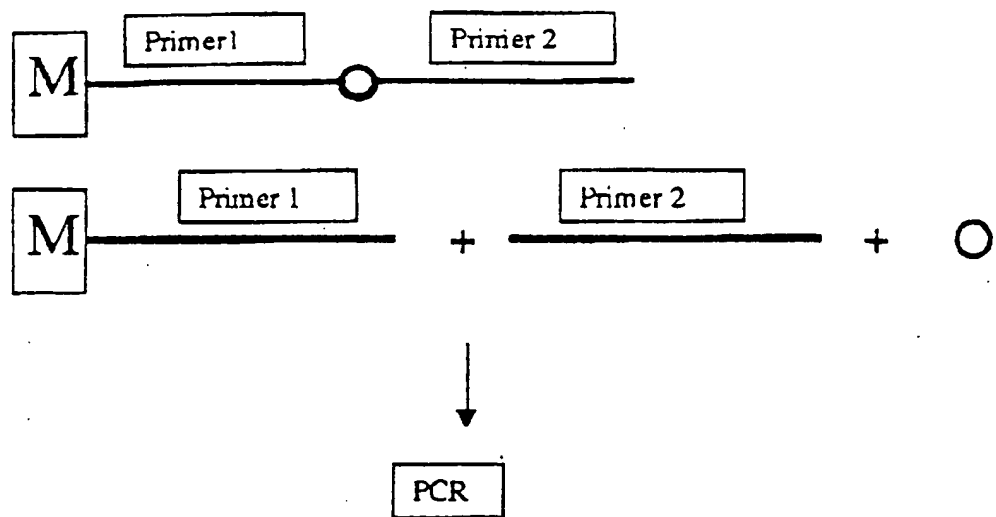
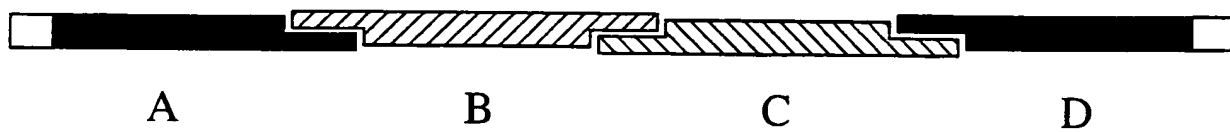


Fig. 1

2/2



Figur 2



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 99/09698

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 C07H21/00 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07H C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 258 506 A (HORN THOMAS ET AL) 2 November 1993 (1993-11-02) the whole document	1-20
X	EP 0 227 976 A (MEIOGENICS INC) 8 July 1987 (1987-07-08) page 25	1-20
X	WO 92 22671 A (CHIRON CORP) 23 December 1992 (1992-12-23) claims 1,5,8	1-20
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 March 2000

Date of mailing of the international search report

07/04/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bardili, W

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/09698

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ENGELS, J.W. ET AL.: "Synthesis and selective cleavage of an oligodeoxynucleotide containing a bridged internucleotide 5'-phosphorothioate linkage"</p> <p>NUCLEIC ACIDS RES., vol. 19, 1991, pages 1437-41, XP002112661 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-20
X	<p>MAG, M. UND ENGELS, J.W. : "Synthesis and selective cleavage of oligodeoxyribonucleotides containing non-chiral internucleotide phosphoramidate linkages"</p> <p>NUCLEIC ACIDS RES., vol. 17, 1989, pages 5973-5988, XP002112660 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-20
X	<p>WO 98 30575 A (NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC ;EATON BRUCE (US); MCGEE DANNY (US); G) 16 July 1998 (1998-07-16) the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-20
X	<p>WO 92 06103 A (ICI PLC) 16 April 1992 (1992-04-16) the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-20

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/09698

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5258506	A	02-11-1993	US 5118605 A	02-06-1992
			US 4775619 A	04-10-1988
			US 5545730 A	13-08-1996
			US 5578717 A	26-11-1996
			US 5552538 A	03-09-1996
			US 5430136 A	04-07-1995
			US 5367066 A	22-11-1994
			AT 133714 T	15-02-1996
			AT 168724 T	15-08-1998
			DE 3854969 D	14-03-1996
			DE 3854969 T	30-05-1996
			DE 3856224 D	27-08-1998
			DE 3856224 T	03-12-1998
			EP 0360940 A	04-04-1990
			EP 0703296 A	27-03-1996
			ES 2083955 T	01-05-1996
			JP 2092300 A	03-04-1990
			JP 2676535 B	17-11-1997
			US 5380833 A	10-01-1992
EP 0227976	A	08-07-1987	US 4876187 A	24-10-1989
			AU 601383 B	13-09-1990
			AU 6610886 A	11-06-1987
			CA 1304703 A	07-07-1992
			FI 864964 A	06-06-1987
			JP 2742905 B	22-04-1998
			JP 8242896 A	24-09-1996
			JP 2691177 B	17-12-1997
			JP 62190086 A	20-08-1987
			US 5011769 A	30-04-1991
WO 9222671	A	23-12-1992	CA 2110591 A	23-12-1992
			EP 0610215 A	17-08-1994
			JP 11235198 A	31-08-1999
			JP 6509707 T	02-11-1994
WO 9830575	A	16-07-1998	AU 6022798 A	03-08-1998
			AU 6240698 A	03-08-1998
			EP 0968223 A	05-01-2000
			WO 9830720 A	16-07-1998
WO 9206103	A	16-04-1992	AU 665174 B	21-12-1995
			AU 8650991 A	28-04-1992
			CA 2093356 A	05-04-1992
			EP 0552185 A	28-07-1993
			JP 6501692 T	24-02-1994

PCT/EP 99/09698

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/09698

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr
X	<p>ENGELS, J.W. ET AL.: "Synthesis and selective cleavage of an oligodeoxynucleotide containing a bridged internucleotide 5'-phosphorothioate linkage"</p> <p>NUCLEIC ACIDS RES., Bd. 19, 1991, Seiten 1437-41, XP002112661 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-20
X	<p>MAG, M. UND ENGELS, J.W. : "Synthesis and selective cleavage of oligodeoxyribonucleotides containing non-chiral internucleotide phosphoramidate linkages"</p> <p>NUCLEIC ACIDS RES., Bd. 17, 1989, Seiten 5973-5988, XP002112660 das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-20
X	<p>WO 98 30575 A (NEXSTAR PHARMACEUTICALS INC ; EATON BRUCE (US); MCGEE DANNY (US); G) 16. Juli 1998 (1998-07-16) das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-20
X	<p>WO 92 06103 A (ICI PLC) 16. April 1992 (1992-04-16) das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-20

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/09698

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5258506 A	02-11-1993	US 5118605 A	02-06-1992
		US 4775619 A	04-10-1988
		US 5545730 A	13-08-1996
		US 5578717 A	26-11-1996
		US 5552538 A	03-09-1996
		US 5430136 A	04-07-1995
		US 5367066 A	22-11-1994
		AT 133714 T	15-02-1996
		AT 168724 T	15-08-1998
		DE 3854969 D	14-03-1996
		DE 3854969 T	30-05-1996
		DE 3856224 D	27-08-1998
		DE 3856224 T	03-12-1998
		EP 0360940 A	04-04-1990
		EP 0703296 A	27-03-1996
		ES 2083955 T	01-05-1996
		JP 2092300 A	03-04-1990
		JP 2676535 B	17-11-1997
		US 5380833 A	10-01-1992
EP 0227976 A	08-07-1987	US 4876187 A	24-10-1989
		AU 601383 B	13-09-1990
		AU 6610886 A	11-06-1987
		CA 1304703 A	07-07-1992
		FI 864964 A	06-06-1987
		JP 2742905 B	22-04-1998
		JP 8242896 A	24-09-1996
		JP 2691177 B	17-12-1997
		JP 62190086 A	20-08-1987
		US 5011769 A	30-04-1991
WO 9222671 A	23-12-1992	CA 2110591 A	23-12-1992
		EP 0610215 A	17-08-1994
		JP 11235198 A	31-08-1999
		JP 6509707 T	02-11-1994
WO 9830575 A	16-07-1998	AU 6022798 A	03-08-1998
		AU 6240698 A	03-08-1998
		EP 0968223 A	05-01-2000
		WO 9830720 A	16-07-1998
WO 9206103 A	16-04-1992	AU 665174 B	21-12-1995
		AU 8650991 A	28-04-1992
		CA 2093356 A	05-04-1992
		EP 0552185 A	28-07-1993
		JP 6501692 T	24-02-1994